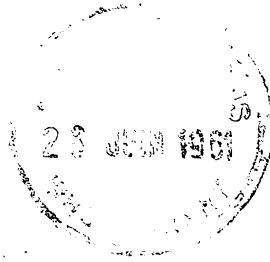


a 61767



WHO/Mal/280  
10 novembre 1960

ORIGINAL : ANGLAIS

TRANSFERT DE PARASITES DU SANG (PLASMODIUMS ET TRYPANOSOMES)  
ENTRE ÉTALEMENTS ÉPAIS PENDANT LA COLORATION DE MASSE

par :

M. G. T. Shute, Technicien de laboratoire,  
Équipe antipaludique de l'OMS, Zanzibar

INTRODUCTION

Brooke & Donaldson (1948) ont montré que les parasites du paludisme peuvent être transférés d'un étalement de sang à un autre lorsqu'on utilise la technique de coloration de masse de Barber & Komp. Selon cette technique, la coloration s'effectue sur des blocs de lames maintenues ensemble par un élastique, mais séparées les unes des autres, à leurs extrémités, par des lamelles de carton. Les blocs sont placés dans une cuve à coloration et recouverts de colorant. Pour les tests décrits dans le présent mémoire, nous avons utilisé une autre méthode : les lames, placées verticalement dans une cuve à coloration, étaient séparées les unes des autres par les rainures de la cuve qui laissaient entre elles plus d'espace que ne le font les lamelles de carton de Barber & Komp. Au cours d'autres travaux, Brooke & Donaldson (1950) et Donaldson & Brooke (1950) ont montré qu'avec les solutions colorantes de Giemsa, l'addition de 0,5 % d'une solution aqueuse de Triton X-100 (polyester alkylarylique) à 33 % empêche presque complètement le transfert de parasites du paludisme d'un étalement à l'autre. Pour ces auteurs, il est possible que les particules de sang détachées des lames pendant la coloration remontent à la surface de la solution et y soient maintenues par la tension superficielle; elles peuvent alors se fixer sur d'autres étalements quand le bloc de lames est retiré du colorant. Mais si l'on abaisse la tension superficielle des solutions colorantes par addition de Triton X-100, les particules de sang tombent au fond de la cuve. Les mêmes auteurs ont montré que, dans certaines conditions

de coloration, le taux de transfert des parasites peut dépasser 40 %. Les expériences que nous décrivons ici ont été effectuées en partie pour confirmer les observations de Brooke & Donaldson, mais nous avons surtout cherché à obtenir des renseignements sur le mécanisme du transfert et à découvrir quelles sont, dans les opérations de coloration, les facteurs courants les plus susceptibles de provoquer ce phénomène. Nous comptons arriver ainsi à mettre au point une technique qui soit utilisable par les laboratoires de campagne et qui réduise à un minimum les transferts de parasites.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Le problème du transfert des parasites du paludisme à partir d'étalements épais positifs pendant la coloration de masse a une importance pratique considérable. Il est évident qu'un diagnostic erroné, dû à la "contamination" d'un étalement négatif par des particules provenant d'un étalement positif ébranle la confiance que l'on peut avoir dans des examens de sang pour dépister les cas de paludisme et désorganise tout le système de surveillance. Le problème de la technique d'examen la plus sûre doit être entièrement repris et les recherches dans ce sens seront certainement encouragées à l'échelon régional par les responsables des étapes terminales des campagnes d'éradication.

Il faudrait que les résultats exposés ici soient confirmés par d'autres chercheurs dont les observations seraient très précieuses.

Les recommandations pratiques fondées sur les travaux de M. Shute et dont l'application peut être immédiate sont les suivantes :

1. La technique consistant à préparer sur la même lame des étalements épais du sang de plusieurs individus devrait être abandonnée. La méthode la plus sûre peut se résumer ainsi "une lame par individu".
2. La possibilité de transfert de parasites d'une lame à une autre existe également avec les méthodes de coloration de masse en cuve ou par blocs de lames; ce n'est cependant pas une raison d'abandonner ces méthodes qui sont rapides, pratiques et économiques, sans essayer de les améliorer. Lors des examens de sang effectués pour rechercher les parasites du paludisme, il faut veiller davantage à appliquer correctement la technique de coloration et prêter une attention scrupuleuse au moindre détail de manipulation des lames (en particulier s'il s'agit de lames portant des étalements épais).
3. Les conditions les plus importantes à respecter pour écarter les risques de transfert de parasites sont les suivantes :
  - a) éviter d'agiter la solution colorante pendant l'opération de coloration ou pendant les manipulations ultérieures portant sur un bloc de lames;
  - b) évacuer avec soin la couche supérieure de solution colorante avant rinçage et manipuler avec précaution les étalements épais;
  - c) ajouter à la solution colorante (avant coloration) 0,5 % d'une solution à 33 % de Triton X-100.
4. S'il n'y a qu'un petit nombre de lames à colorer, il est préférable d'opérer en plaçant les lames horizontalement, l'étalement de sang regardant vers le bas, auquel cas l'addition de détergent n'est pas nécessaire.
5. Pour la coloration de blocs de lames avec le colorant JSB, il est nécessaire, en plus des précautions mentionnées sous 3 a) et 3 b), soit de renouveler la solution I pour chaque groupe de lames, soit de la filtrer sur papier. (Note de l'éditeur)

## TECHNIQUE EXPERIMENTALE

Dans les tests 1 à 4, les étalements de sang ont été colorés au Giemsa dilué dans une solution tampon phosphatée de pH 7,2. La solution colorante contenait 3,5 ml de Giemsa pour 100 ml de tampon, c'est-à-dire 1 goutte 1/4 de colorant par ml de tampon. Les étalements ont été colorés pendant 30 minutes, 24 à 48 heures après la prise de sang. Nous avons observé ce délai parce que, selon l'expérience acquise en Afrique orientale tropicale, c'est ainsi qu'en général on obtient les meilleures colorations.

### Test 1

Un seul étalement épais de sang parasité a été fait sur chacune des lames d'une même série, une autre série d'étalements étant préparée avec du sang non parasité. Les lames ont été placées dans des cuves à coloration, les étalements positifs faisant face aux étalements négatifs. Après coloration, nous avons débarrassé la surface du colorant de l'écume qui s'y était formée en faisant couler doucement de l'eau distillée dans les cuves jusqu'à ce qu'elles débordent. Nous avons pris grand soin d'agiter le moins possible la solution colorante lorsque les étalements de sang y étaient immergés. Les lames ont été alors retirées une à une, lavées sous un jet d'eau distillée et posées de chant pour égouttage et séchage. Deux tests ont été effectués suivant cette technique; les détails en sont donnés dans les sections 1.1 et 1.2 et les résultats en sont résumés dans le tableau 1.

1.1 Les étalements épais positifs utilisés pour ce test contenaient des Plasmodium vivax à raison de 13 000 parasites par  $\text{mm}^3$  de sang; 88 étalements négatifs ont été examinés : aucun parasite n'avait été transféré d'un étalement positif à un étalement négatif.

1.2 Pour effectuer ce test, nous avons préparé des étalements de sang contenant Trypanosoma rhodesiense à raison d'environ 1 million de parasites par  $\text{mm}^3$ . Le sang avait été prélevé sur un rat infesté au laboratoire par injection sous-cutanée, plusieurs jours auparavant. La densité parasitaire avait été calculée d'après le nombre moyen de parasites découverts par champ microscopique dans un étalement mince. Cinquante-trois étalements négatifs ont été examinés : des trypanosomes avaient été transférés sur 13 d'entre eux; ils formaient de petits groupes ou étaient isolés.

Test 2

C'est la technique de coloration décrite pour le test 1 qui a été utilisée pour cette nouvelle série de tests. Après coloration, la cuve était vidée de la solution colorante, puis remplie d'eau distillée fraîche et enfin secouée pour laver les lames. L'eau distillée était alors évacuée, les lames retirées de la cuve et mises à sécher. Trois tests ont été réalisés dans cette série. Ils sont décrits dans les sections 2.1, 2.2 et 2.3 et leurs résultats sont résumés dans le tableau 2.

2.1 Nous avons utilisé des étalements épais contenant P. vivax à raison de 13 600 parasites par  $\text{mm}^3$  de sang. L'examen de 30 étalements négatifs a montré que des parasites avaient été transférés sur 10 d'entre eux. Les parasites transférés étaient éparpillés sur les étalements, un seul par champ microscopique en général, mais parfois en petits groupes.

2.2 Etant donné ce taux élevé de transfert parasitaire et parce que notre procédé de lavage des lames est couramment appliqué, nous avons répété le test en utilisant du sang dont la densité parasitaire était de 600 par  $\text{mm}^3$ . L'examen de 45 étalements négatifs a montré que des parasites avaient été transférés sur un seul d'entre eux. Cet étalement contenait 3 trophozoïtes immatures.

2.3 L'examen de 20 étalements négatifs colorés alors qu'ils étaient placés face à face avec des étalements contenant T. rhodesiense a montré que des trypanosomes avaient été transférés sur 12 d'entre eux. La densité des trypanosomes dans les étalements de sang positifs était si forte que les parasites, après transfert sur les étalements négatifs, formaient souvent de petits groupes entremêlés, séparés par des zones intactes. Cependant, il y avait aussi de nombreux trypanosomes isolés; nous en avons déduit que certains parasites provenant d'étalements positifs n'avaient en tout cas pas été transférés par une particule de sang. Si cette hypothèse était exacte, le même phénomène pouvait se reproduire avec des érythrocytes isolés. Il était donc possible que le transfert de parasites soit non seulement dû au détachement de particules de sang mais également à celui de globules rouges isolés. En admettant que les étalements de sang ne soient pas trop frais et qu'il n'y ait sur les lames ni graisse ni autre contaminant, une particule de sang ne peut probablement se détacher que si l'étalement est légèrement endommagé, par exemple par le jet d'eau de lavage. Au contraire, il est

possible que des érythrocytes se détachent en l'absence apparente d'agitation de la solution colorante, peut-être au cours du processus de deshémoglobinisation. Nous avons étudié cette dernière possibilité avec des parasites du paludisme et avec des trypanosomes (voir test 5).

### Test 3

Quatre étalements épais ont été préparés sur chacune des lames de cette série, à savoir deux étalements de sang parasité par P. vivax, à raison de 3260 parasites par  $\text{mm}^3$  de sang, alternant avec deux étalements de sang non parasité. Les lames ont été placées dans une cuve à coloration, les étalements d'une lame faisant face à ceux de la lame voisine. Après coloration, l'écume superficielle a été évacuée par addition d'eau distillée; les lames ont alors été retirées une à une, lavées sous un jet d'eau distillée et posées de chant pour égouttage et séchage. L'examen de 30 étalements négatifs a montré que des parasites de P. vivax avaient été transférés sur 8 d'entre eux. Les parasites transférés étaient généralement éparpillés à la surface des lames; aucun amas important de parasites n'a été observé et dans trois étalements un parasite seulement a été découvert. Deux seulement des 5 autres étalements contenaient plus d'un parasite par champ microscopique. Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau 3.

Dans tous les tests décrits jusqu'à présent, les étalements étaient colorés dans des cuves rectangulaires où les lames étaient placées de chant, puis recouvertes par le colorant. La méthode adoptée pour le test 1 a été la seule avec laquelle il n'y a pas eu transfert de parasites. Cependant, quand ce test a été répété avec du sang contenant un grand nombre de trypanosomes, il y a eu transfert de parasites. Il est donc à craindre qu'avec cette méthode également, le transfert de parasites puisse être assez fréquent. Pour le test 4, nous avons utilisé des plaques à coloration sur lesquelles les lames reposent à plat, les étalements regardant vers le bas.

### Test 4

Des lames ont été placées, bord à bord, sur une série de plaques à coloration. Sur chaque lame un seul étalement épais avait été préparé et les lames étaient

disposées de telle façon qu'étalements positifs et négatifs alternaient. Chaque plaque supportait cinq lames, dont trois positives. Après coloration, les lames ont été retirées et rincées à l'eau distillée. Deux séries de tests ont été effectuées. Elles sont décrites dans les sections 4.1 et 4.2 et les résultats en sont résumés dans le tableau 4.

4.1 Cent vingt étalements épais ne contenant pas de parasites du paludisme ont été disposés en alternance avec des étalements de sang parasité par P. vivax à raison de 12 000 parasites par  $\text{mm}^3$ . Après coloration, les examens ont montré qu'aucun parasite n'avait été transféré des étalements positifs aux 120 étalements négatifs.

4.2 Trente étalements épais négatifs ont été disposés en alternance avec des étalements épais de sang de rat parasité par T. rhodesiense à raison d'environ 1 000 000 de parasites par  $\text{mm}^3$ . Après coloration, l'examen des étalements négatifs n'a permis de constater un transfert de trypanosomes sur aucun d'entre eux.

Les résultats du test 2,3 nous ont amené à la conclusion que des globules rouges isolés et de petites particules de sang pouvaient se détacher des étalements épais pendant la deshémozoglobinisatlon. Les tests effectués précédemment nous avaient montré que l'agitation des solutions colorantes et des eaux de lavage pouvait provoquer un transfert parasitaire assez important, mais nous ne savions pas encore si des éléments du sang pouvaient se détacher quand cette agitation n'avait pas lieu. Le test 5 a été réalisé pour répondre à cette question.

#### Test 5

Un étalement de sang parasité a été préparé à l'extrémité de chacune des lames d'une même série. Après séchage, nous avons attendu 24 ou 48 heures pour placer les lames sur une plaque, les étalements regardant vers le haut, et pour verser deux ou trois gouttes de solution tampon phosphatée (pH 7,2) sur chaque étalement. La solution recouvrait entièrement ou presque l'étalement et débordait en même temps sur la partie intacte de la lame; après 3 minutes de deshémozoglobinisatlon, la plaque a été légèrement inclinée, mais pas assez pour que le tampon s'écoule de lui-même le long de la lame. En touchant la solution qui avait débordé avec l'extrémité d'une fine baguette

de verre et en provoquant ainsi la formation d'une traînée le long de la lame, nous avons amené cette solution à s'écouler doucement en entraînant celle qui recouvrait l'étalement et qui contenait alors de l'hémoglobine en solution. Après séchage des lames, nous avons remis la plaque en position horizontale, puis versé sur les lames de l'alcool méthylique afin de fixer l'étalement épais et tous les éléments qui auraient pu se répandre sur la lame avec la solution tampon. Les lames ont été alors immergées dans une solution de Giemsa pendant une demi-heure, après quoi nous les avons lavées sous un jet d'eau distillée. Le colorant contenait 8 ml de Giemsa pour 100 ml de solution tampon, c'est-à-dire trois gouttes de colorant par ml de tampon. Les limites de diffusion de la solution tampon étaient nettement marquées après coloration par une ligne brune d'hémoglobine indiquant la surface de lame à examiner au microscope. Les tests effectués suivant cette technique sont décrits dans les sections 5.1 et 5.2.

5.1 Chaque étalement épais contenait des P. vivax à raison de 10 500 parasites par  $\text{mm}^3$  de sang. L'examen de la traînée de solution tampon et d'hémoglobine sur 30 lames a révélé la présence de parasites du paludisme sur 26 d'entre elles. Avec les parasites se trouvaient soit de petites particules de sang, soit des globules rouges isolés qui s'étaient détachés de leur étalement d'origine pour se déposer dans la traînée de solution tampon. Les parasites, généralement isolés, formaient parfois des groupes de 2 ou 3.

5.2 Chaque étalement épais contenait T. rhodensiense à raison d'environ 1 million de parasites par  $\text{mm}^3$  de sang. L'examen microscopique de la traînée de solution tampon et d'hémoglobine sur 55 lames a montré que des trypanosomes s'étaient détachés de 30 étalements. Les trypanosomes s'étaient déposés sur la totalité de la surface de la lame couverte par la traînée d'hémoglobine et de solution tampon. Ils n'étaient pas plus nombreux à la périphérie qu'au centre, presque clair, de la traînée; généralement isolés, ils se présentaient aussi, par endroits, en petits groupes.

## DISCUSSION

Les résultats du test 5 montrent que des éléments du sang peuvent se détacher d'un étalement épais, quelles que soient les conditions de coloration. Ce phénomène est probablement dû à une certaine détérioration subie par l'étalement lorsque l'hémoglobine se sépare des globules rouges. Lors de la coloration d'étalements épais on peut donc prévoir que des particules de sang, dont certaines contiendront peut-être des parasites, seront libérées et se trouveront en suspension dans la solution colorante. Cependant, il est évident que l'agitation des solutions de coloration ou de lavage est le facteur qui favorise le plus le dépôt de ces parasites en suspension sur les étalements de sang. La comparaison des résultats des tests 1 et 2 le montre bien. Il faut donc éviter d'agiter les solutions pendant que les étalements y sont immergés.

Le test 3 montre qu'il est contre-indiqué de préparer plusieurs étalements de sang sur la même lame. La technique de coloration utilisée pour ce test était la même que celle utilisée pour le test 1. Bien que la densité parasitaire ait été bien plus forte dans le test 1.1 que dans le test 3, le taux de transfert parasitaire a été beaucoup plus élevé pour le second. Cela s'explique à notre avis par le fait que des globules détachés des étalements positifs avaient glissé le long de la lame et s'étaient déposés sur les étalements négatifs pendant que les lames égouttaient et séchaient.

Il est difficile d'expliquer pourquoi le transfert parasitaire ne s'est pas produit quand nous avons utilisé des plaques à coloration au lieu de cuves. Les résultats du test 4.2, dans lequel la densité de T. rhodesiense sur les lames était très forte, montrent que les risques de transfert de parasites entre étalements sont, en tout cas, faibles quand cette technique de coloration est utilisée. Il est très possible que l'hypothèse de Brooke & Donaldson (1950), selon laquelle les globules détachés sont maintenus à la surface du colorant par la tension superficielle ou par l'écume qui se forme dans les cuves contenant du colorant de Giemsa, explique les résultats obtenus avec les plaques à coloration. En effet, quand ces plaques sont utilisées, l'écume peut se former seulement aux extrémités de la rangée de lames et ne peut agir sur les particules de sang détachées des lames. Il est possible que ces particules tombent au fond de la solution, comme elles paraissent le faire quand du polyesther alkylarylique

est utilisé pour réduire la tension superficielle des solutions. Dans un climat chaud, les étalements gardés quelques jours ne perdront probablement pas de particules de sang au moment de la coloration et il n'y aura pas de transfert parasitaire, probablement parce qu'il se produit naturellement une fixation partielle du sang. Mais c'est là une méthode qui ne peut être appliquée pour empêcher le transfert parasitaire, car il en résulte une perte importante de définition pour l'examen des parasites colorés.

#### Observations sur la morphologie des parasites transférés

Pour rechercher les déformations éventuelles, les P. vivax transférés d'un étalement à un autre ont été examinés par l'auteur, et par d'autres spécialistes ayant plus d'expérience de la morphologie de cette espèce. Des déformations ont été observées dans certains cas, en particulier sur des schizontes, sur des gamétocytes ou sur des trophozoïtes matures. Beaucoup d'autres formes, cependant, semblaient tout à fait normales et il n'a jamais été possible de déceler d'anomalies sur les trophozoïtes jeunes. Nous estimons que la proportion de parasites déformés était trop faible pour permettre de dire si la positivité des lames était due à un transfert de parasites à partir d'autres lames ou à une infestation véritable. L'examen des parasites transférés a montré que beaucoup d'entre eux avaient subi d'importantes déformations. Bon nombre de petits groupes de trypanosomes paraissaient entremêlés, probablement parce que la particule de sang à laquelle ils étaient attachés s'était repliée en entrant en contact avec l'étalement négatif. Les trypanosomes isolés étaient souvent fragmentés, ce qui n'a jamais été observé avec les parasites du paludisme. Il est possible que les plasmodiums, grâce à leur localisation intracellulaire, soient protégés par la capsule relativement épaisse des globules rouges de leur hôte; les trypanosomes au contraire, qui sont extracellulaires, restent sans protection et peuvent donc être altérés.

#### RESUME

Des étalements épais contenant P. vivax ou T. rhodesiense ont été utilisés pour mettre en évidence le transfert de parasites entre étalements épais pendant la coloration de masse. Le taux de transfert en cuve à coloration a augmenté lorsque les

solutions étaient agitées au moment de l'immersion des lames ou que des étalements multiples, à la fois positifs et négatifs, étaient portés par une même lame. D'autres tests ont montré que des globules rouges isolés pouvaient se détacher d'un étalement épais pendant la déshémoglobination. Nous en avons conclu que, avec les techniques actuelles de coloration, de petites particules de sang risquent toujours de se détacher des étalements épais et de flotter dans les solutions colorantes. L'examen des parasites transférés a montré chez P. vivax des déformations trop peu marquées pour être d'un intérêt diagnostique quelconque mais d'importantes déformations ont été observées sur T. rhodesiense.

Si les lames de sang portent un seul étalement et sont placées en position horizontale pour la coloration, le transfert de parasites est évité.

#### REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement Sir Gordon Cowell, M. P. G. Shute et Mlle M. Maryon, du Malaria Reference Laboratory, Medical Research Council, Angleterre, de m'avoir procuré du sang parasité et d'avoir mis à ma disposition les installations et le matériel de laboratoire qui m'ont permis de réaliser la plus grande partie de ce travail. Leurs avis et leurs observations critiques m'ont également été d'un grand secours. Je tiens également à remercier le Dr W. J. Stoker qui m'a aidé à rédiger cet article ainsi que le Directeur de la Division de l'Eradication du Paludisme de l'OMS, qui m'a autorisé à le publier.

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brooke, M. M. & Donaldson, A. W. (1948) Publ. Hlth Rep. (Wash.), 63, 991  
Brooke, M. M. & Donaldson, A. W. (1950) J. Parasit., 36, 84  
Donaldson, A. W. & Brooke, M. M. (1950) J. nat. Malar. Soc., 9, 239

TABLEAU 1. TRANSFERT DE PARASITES SUR DES ETALEMENTS NEGATIFS  
LORSQU'IL N'Y A PAS AGITATION DES SOLUTIONS OU LES LAMES SONT IMMERGEES

Numéros des tests	Parasites soumis aux tests		Examens pour recherche du transfert		
	Espèce	Nombre de parasites par mm <sup>3</sup> de sang	Nombre d'étalements négatifs examinés	Nombre d'étalements contenant des parasites transférés	Taux de transfert
1.1	<u>P. vivax</u>	13 000	88	0	0
1.2	<u>T. rhodensiense</u>	1 000 000	53	13	24

TABLEAU 2. TRANSFERT DE PARASITES SUR DES ETALEMENTS NEGATIFS  
LORSQU'IL Y A AGITATION DES SOLUTIONS OU LES LAMES SONT IMMERGEES

Numéros des tests	Parasites soumis aux tests		Examens pour recherche du transfert		
	Espèce	Nombre de parasites par mm <sup>3</sup> de sang	Nombre d'étalements négatifs examinés	Nombre d'étalements contenant des parasites transférés	Taux de transfert
2.1	<u>P. vivax</u>	13 600	30	10	33
2.2	<u>P. vivax</u>	600	45	1	2
2.3	<u>T. rhodensiense</u>	1 000 000	20	12	60

TABLEAU 3. TRANSFERT DE PARASITES SUR DES ETALEMENTS NEGATIFS  
LORSQUE DES ETALEMENTS POSITIFS ET NEGATIFS ALTERNENT SUR LES MEMES LAMES

Numéros des tests	Parasites soumis aux tests		Examens pour recherche du transfert		
	Espèce	Nombre de parasites par mm <sup>3</sup> de sang	Nombre d'étalements négatifs examinés	Nombre d'étalements contenant des parasites transférés	Taux de transfert
3.	<u>P. vivax</u>	3 260	30	8	27

TABLEAU 4. TRANSFERT DE PARASITES LORSQUE LES ETALEMENTS  
EPAIS SONT COLORES SUR PLAQUES

Numéros des tests	Parasites soumis aux tests		Examens pour recherche du transfert		
	Espèce	Nombre de parasites par mm <sup>3</sup> de sang	Nombre d'étalements négatifs examinés	Nombre d'étalements contenant des parasites transférés	Taux de transfert
4.1	<u>P. vivax</u>	12 000	120	0	0
4.2	<u>T. rhodensiense</u>	1 000 000	30	0	0